蝶蛹金小蜂毒液蛋白不同提取分离方法的比较

吴玛莉，朱家颖，胡 萃，叶恭银*
（浙江大学昆虫科学研究所，杭州 310029）

摘要：为了建立蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 毒液抑制寄主血细胞免疫活性组分合适的分离纯化方法，就等电点沉淀法、乙醇沉淀法、75%硫酸铵沉淀法、75%硫酸铵沉淀法＋40℃加热处理法，以及75%硫酸铵沉淀法分别与3种不同滤膜的分子大小截留法的组合等7种方法对毒液蛋白分离效果及活性的影响进行了比较。结果表明：等电点沉淀法获得的组分抑制寄主菜粉蝶 *Pieris rapae* 离体血细胞延展和包囊的活性最强，乙醇沉淀法次之，75%硫酸铵沉淀法最弱。从蛋白组分的SDS-PAGE图谱来看，等电点沉淀法获得毒液组分相对最纯，仅有3条主要谱带，分子量大小在45～116.2 kDa范围内；乙醇沉淀法次之，有5条主要谱带，分子量大小在24～116.2 kDa范围内；硫酸铵沉淀法的谱带组成与毒液蛋白粗提液相似。3种分子大小截留法获得的毒液组分的活性分析表明，强活性组分分子量大小可能都大于100 kDa。综合认为，7种方法中以等电点沉淀法提取分离蝶蛹金小蜂毒液蛋白相对为最适。

关键词：蝶蛹金小蜂；菜粉蝶；毒液；分离；血细胞延展；血细胞包囊
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2008)11-1144-07

Comparison of different methods for extraction and isolation of venom proteins from *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae)

WU Ma-Li，ZHU Jia-Ying，HU Cui，YE Gong-Yin* (Institute of Insect Sciences，Zhejiang University，Hangzhou 310029，China)

Abstract: For developing a suitable isolation and purification method of *Pteromalus puparum* venom proteins with the activity to inhibit host hemocyte spreading and encapsulation，seven methods，namely，isoelectric precipitation，ethanol precipitation，75% ammonium sulphate precipitation，75% ammonium sulphate precipitation combined with heating at 40℃，75% ammonium sulphate precipitation combined with three different centrifugal size exclusion membranes (molecular weight cut-off exclusion limit: 10，50 and 100 kDa)，were compared. The results indicated that the isoelectric precipitated fractions had the highest activity to inhibit the spreading and encapsulation of host *Pieris rapae* hemocytes *in vitro*，the ethanol precipitated fractions acted the second，while 75% ammonium sulphate precipitated fractions showed the lowest. The results of SDS-PAGE analysis demonstrated that the purity of the isoelectric precipitated fractions was the highest with only three main protein bands with apparent molecular masses ranging from 45 to 116.2 kDa，the ethanol precipitated fractions showed five main protein bands with apparent molecular masses ranging from 24 to 116.2 kDa，and the protein profiles of ammonium sulphate precipitated fractions had nearly identical protein profiles as crude venom. To compare the activity of venom fractions from three different centrifugal size exclusion membranes，the molecular weight of the fractions with higher activity might be more than 100 kDa. It is concluded that the method of isoelectric precipitation is relatively most suitable among the seven tested methods for isolation of *P. puparum* venom.

Key words: *Pteromalus puparum*；*Pieris rapae*；venom；isolation；hemocyte spreading；hemocyte encapsulation

---

基金项目：国家重点基础研究发展规划（“973”计划）项目（2006CB102005）；国家自然科学基金项目（30571251）；教育部“新世纪优秀人才支持计划”（NCET-05-0513）
作者简介：吴玛莉，女，1977年8月生，贵州六盘水人，博士研究生，研究方向为昆虫生理生化，E-mail：mary.zb@163.com
*通讯作者 Author for correspondence，E-mail：chu@zju.edu.cn
收稿日期 Received：2008-08-11；接收日期 Accepted：2008-10-18

寄生蜂毒液含有丰富的蛋白质、肽和酶类，能单独或辅助其他雌蜂携带因子如多分 DNA 病毒和卵巢蛋白抑制寄主血细胞免疫或调控寄主生长发育等，以确保寄主体内微环境有利于其子代生存与发育（Beckage and Gelma，2004；Asgari，2006；Pennacchio and Strand，2006）。根据文献统计（截至 2007 年），已有 2 种姬蜂、4 种茧蜂、1 种环腹瘿蜂和 1 种金小蜂的毒液组分及其性质得到不同程度的研究（Moreau and Guillot，2005；Asgari，2007；朱家颖等，2008），但目前仅在寄生黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的匙胸瘿蜂 *Leptopilina boulardi*（Labrosse *et al*.，2005a，2005b）和寄生菜粉蝶 *Pieris rapae* 幼虫的微红盘绒茧蜂 *Cotesia rubecula*（Zhang *et al*.，2006）的毒液中发现了具有抑制寄主血细胞免疫的组分。其原因主要一方面在于没有建立起毒液的高效分离纯化方法，另一方面毒液本身的微量性也使分离纯化和活性验证增加了难度。为此，我们在已经明确菜粉蝶蛹期寄生蜂蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 毒液基本生化性质与生理活性（Cai *et al*.，2004；张忠等，2004；Zhang *et al*.，2005；Zhu *et al*.，2008）的基础上，重点比较该蜂毒液分离提纯的 7 种方法，以为进一步纯化并验证毒液中具有抑制寄主血细胞免疫的活性组分奠定基础。

1　材料和方法

1.1　试虫

蝶蛹金小蜂系实验室种群，自 1998 年于人工气候室内（25 ± 1℃，RH 75%，L∶D = 14∶10）饲养至今。菜粉蝶采自杭州郊区，成虫置室外放有盆栽甘蓝的四周覆盖 80 目尼龙纱的产卵笼（3 m × 2 m × 3 m）内产卵，任其产卵于甘蓝叶片上并孵化。幼虫孵化后仍留在盆栽甘蓝上取食，生长至 3 龄时收集到人工气候室内继续以甘蓝叶片饲养，直至化蛹。所用甘蓝及其叶片均移栽或采至不用任何化学农药的网室大棚内。蝶蛹金小蜂始终饲养保育于上述条件人工气候室内。羽化后，成蜂按 1∶2 的雌雄比转移至附有一个蘸透 20% 蜂蜜水脱脂棉球的“子弹形”大玻璃管中，管口扎以纱布，任其取食、交配，3 d 后用于接蜂。接蜂时，先把化蛹 12 h 内的菜粉蝶蛹放入 1.8 cm × 8.2 cm 的指形管内，每管 1 头，然后接入羽化后 3 d 且已集中交配过的雌蜂 1 头，以棉花塞口，观察并标记被寄生的蛹，并置于人工气候室内饲养至子蜂羽化。子蜂置“子弹形”大玻璃管内，饲以 20% 蜂蜜水，供实验用。

1.2　毒液蛋白的提取及分离纯化

1.2.1　毒蛋白提取：在解剖镜下，于 0℃ 冰浴上解剖 300 头左右发育 5 d 以上的蝶蛹金小蜂毒囊，置 30 μL 20 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS）（pH 7.2）中研磨，4℃ 下以 12 000 r/min 离心 15 min，弃沉淀，收集上清备用。

1.2.2　等电点沉淀法：将毒蛋白提取液蛋白浓度调整为 279.44 μg/mL，参照 Harris 和 Angal（1995）法按 1∶2 体积比例与 0℃ 预冷的 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液（pH 5.0）反应。充分振荡后于冰浴中反应 5 min，4℃ 下以 10 000 r/min 离心 10 min，弃上清，用 PBS 缓冲液溶解沉淀，再将溶解液加入脱盐柱 Micro-Bio-spin P-6（Bio-Rad）中，并置 0℃ 下以 3 200 r/min 离心 4 min，收集洗脱液。

1.2.3　乙醇沉淀法：将毒蛋白提取液蛋白浓度调整为 279.44 μg/mL，参照 Harris 和 Angal（1995）法按 1∶1 体积比例和 − 30℃ 预冷的无水乙醇反应，适当振荡后在 − 30℃ 下反应 10 min，置 4℃ 下以 12 000 r/min离心 5 min，弃上清，置于冰浴上，在真空抽干机中将乙醇抽干，加入 PBS 缓冲液溶解沉淀。

1.2.4　硫酸铵沉淀法：将毒液蛋白浓度调整为 168.33 μg/mL，按照 Simpson（2004）法配制 100% 饱和硫酸铵[$(NH_4)_2SO_4$]溶液，将饱和硫酸铵溶液加入毒液粗提液，至饱和度 70% 后充分振荡，于冰浴中反应 10 min，0℃ 下以 10 000 r/min 离心 15 min，弃上清，用 PBS 缓冲液溶解沉淀，再将溶解液加入脱盐柱 Micro-Bio-Spin P-6（Bio-Rad）中，并置 0℃ 下以 3 200 r/min 离心 4 min，收集洗脱液。

1.2.5　硫酸铵沉淀法 + 加热法处理法：按照 1.2.4 法处理毒液后于 40℃ 加热 10 min，4℃ 下以 10 000 r/min离心 15 min，取上清。

1.2.6　硫酸铵沉淀法 + 分子大小截留法：按照 1.2.4 法处理毒液后，选用分子量截留范围不同的超滤管（millpore）YM-10、YM-50 和 YM-100（滤膜截留分子量分别（10，50 和 100 kDa），分别进行超滤处理，4℃ 下以 6 000 r/min 离心 10 min 后，弃离心管，将滤头倒置于新的 1.5 mL 离心管中，用 PBS 缓冲液于同样离心条件下冲洗膜上的毒液蛋白，收集滤液。

1.3　毒液蛋白浓度的测定

采用 Bradford（1976）定量法，分别测定毒蛋白提取液和各分离方法纯化所得毒液的蛋白含量，并以牛血清白蛋白（BSA）为标准，建立标准曲线。

1.4　菜粉蝶蛹血细胞延展和包囊力的测定

血细胞延展率考查：在超净台上用 75% 的酒精消毒化蛹后 1 d 的菜粉蝶蛹体表，用解剖针刺破蛹翅芽处收集血淋巴 30 μL，将血淋巴加入含 5 μL 苯基硫脲（PTU）饱和溶液和 5 μL 抗凝液（100 mL 无菌水中含 NaCl 0.9 g，KCl 0.942 g，$CaCl_2$ 0.082 g，EDTA 2 g）的 1.5 mL 无菌离心管中。将其与 150 μL 的 TC-100 昆虫细胞培养液混合，尔后分别加入 96 孔板培养板中，每孔加 20 μL 混合液。接着，分别将等体积（1 μL）的各提取分离方法所得毒液分离液加入相应的孔中，同时设加等体积的 PBS 缓冲液和毒液粗提液为阴性和阳性对照。此后，置 27℃ 细胞培养箱中分别培养 0.5 h 和 4 h，参照张忠等（2004）在 Lecia 倒置显微镜上于 200 倍下随机选 3 个视野观察血细胞的延展，计算血细胞延展率。最后，参照 Zhang 等（2005）计算各处理法所得毒液分离液的相对活性，即单位（ng）毒液蛋白组分的血细胞延展抑制率（%/ng protein）= [（阴性对照后血细胞延展率 - 处理后血细胞延展率）/ 阴性对照后血细胞延展率 × 100]/毒液分离液蛋白浓度。重复 3 次。

血细胞包囊率考查：血细胞采样和毒液分离液处理方法同上，所不同的是在加入毒液分离液后还向每孔中加入约 10 粒 Sephadex A-50 微珠。同时，设分别加等体积的 PBS 缓冲液和毒液粗提液为阴性和阳性对照。此后，置 27℃ 细胞培养箱中培养 4 h，参照张忠等（2004）在 Lecia 倒置显微镜上观察各处理微珠被血细胞的包囊粒数及包囊程度，计算包囊指数。最后，参照 Zhang 等（2005）计算各处理法所得毒液分离液相对活性，即单位（ng）毒液蛋白血细胞包囊抑制率（%）= {（阴性对照后血细胞包囊指数 - 处理后血细胞包囊指数）/ 阴性对照后血细胞包囊指数 × 100}/毒液分离液蛋白浓度。重复 3 次。

1.5 SDS-PAGE 电泳分析

参照 Laemmli（1970）的方法，分别对毒蛋白提取液和不同分离纯化方法获得的毒蛋白液进行 SDS-PAGE 电泳分析，其中分离胶浓度为 10%、浓缩胶浓度为 4%。以 Mini-PROTEAN® 3 电泳槽（Bio-Rad）进行 80V 恒压电泳，电泳 3 h 。最后，参照 Swain 和 Ross（1995）法进行银染、脱色。

1.6 数据分析

采用 DPS 数据处理系统（Version 8.50）（唐启义和冯明光，2007）以 Duncan's 新复极差法分析比较各种提纯分离方法所得毒液对血细胞延展和包囊抑制率之间的差异显著性，其中分析前百分率数据先进行反正弦平方根转换。

2 结果

2.1 不同提取分离方法所得毒液组分抑制菜粉蝶血细胞延展的活性比较

菜粉蝶血细胞延展率离体测定结果（图 1）表明，等电点沉淀法等 7 种毒液提取分离方法所得组分与毒液粗提液一样，不论离体培养处理 0.5 h 还是 4 h 均能抑制血细胞延展，即不能形成伪足，而 PBS 处理的对照血细胞则能正常延展并形成明显的伪足。

方差分析结果表明，不论离体培养处理 0.5 h 还是 4 h，不同提取分离方法所得毒液组分在抑制菜粉蝶血细胞延展的活性方面具有极显著差异（0.5 h：$F = 573.77$，$df = 7, 23$，$P = 0.0001$；4 h：$F = 27727.24$，$df = 7, 23$，$P = 0.0001$）。与毒液粗提液相比，7 种提取分离方法中等电点沉淀法所得单位毒液蛋白组分抑制菜粉蝶血细胞延展的活性表现最强，其次是乙醇沉淀法，硫酸铵沉淀法 + YM-10 为滤膜的分子大小截留法则表现最弱（表 1）。就 3 种分子大小截留法比较而言，因采用的滤膜截留蛋白分子量大小而异，其中 YM-100 最强，YM-50 次之，YM-10 最弱，说明表现强活性的毒液组分分子量大小多大于 10 kDa，其中又更多集中于接近或大于 100 kDa。

2.2 不同提取分离方法所得毒液组分抑制菜粉蝶血细胞包囊的活性比较

菜粉蝶血细胞包囊率离体测定结果（图 2）表明，等电点沉淀法等 7 种毒液提取分离方法所得组分与毒液粗提液一样，均能抑制血细胞对异物（Sephadex A-50 微珠）的包囊作用，即微珠未被血细胞包囊或仅粘附有少量血细胞，其中活性弱的粘附血细胞数量相对为多。但在 PBS 处理的对照中微珠被血细胞全面包囊并出现黑化，说明对照血细胞包囊作用明显。

方差分析结果表明，离体培养处理 4 h 后，毒液不同提取分离方法对其所得毒液组分抑制菜粉蝶血细胞包囊率的活性具有极显著影响（$F = 112.25$，$df = 7, 23$，$P = 0.0001$）。7 种提取分离方法中，等电点沉淀法所得单位毒液蛋白组分抑制菜粉蝶血细胞包囊率的活性表现最强，其次是乙醇沉淀法，硫酸铵沉淀法 + YM-10 为滤膜的分子大小截留法则表现最弱（表 1）。就 3 种分子大小截留法比较而言，其结果与抑制血细胞延展相同，即 YM-100 最强，YM-50 次之，YM-10 最弱。

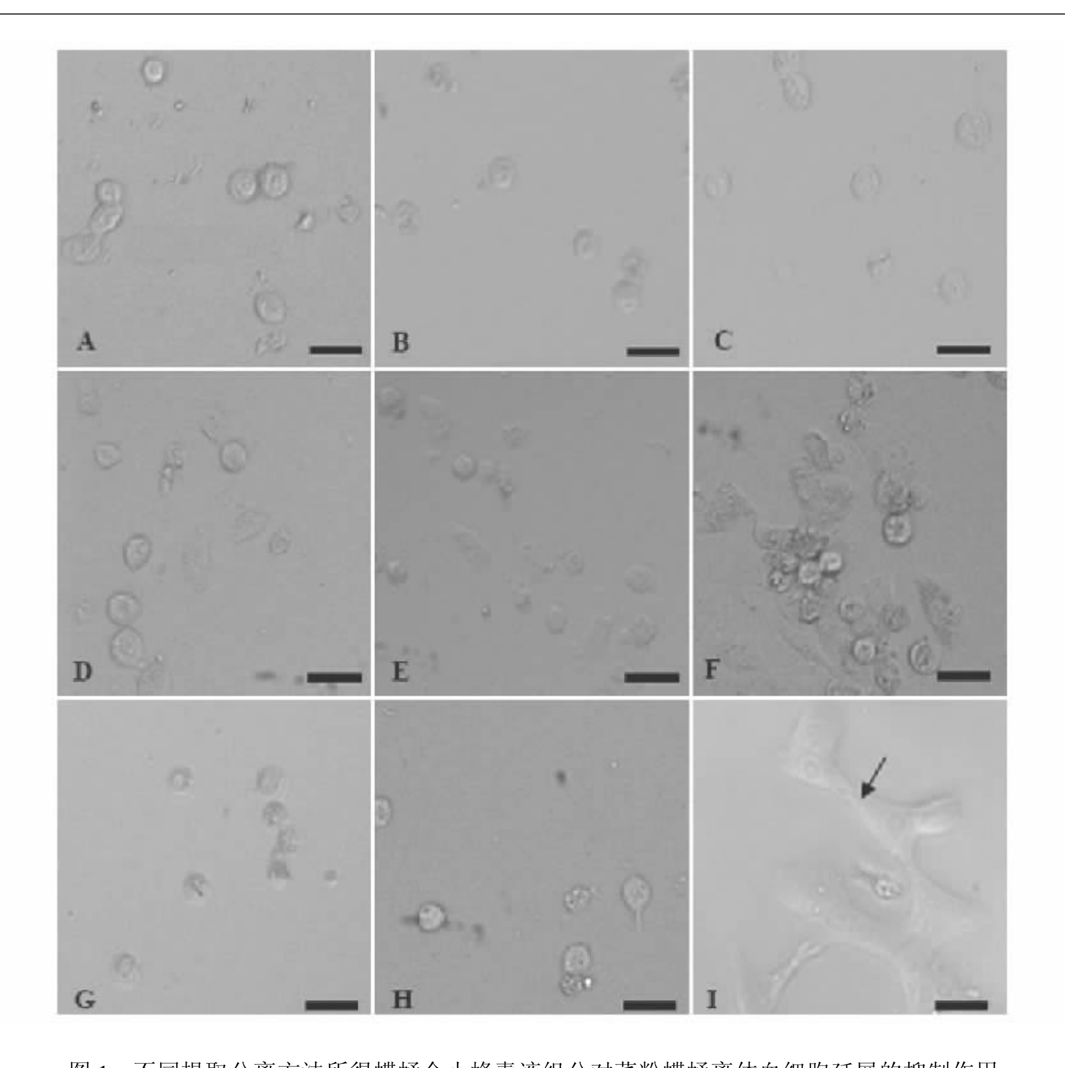


图 1 不同提取分离方法所得蝶蛹金小蜂毒液组分对菜粉蝶蛹离体血细胞延展的抑制作用

Fig. 1 Inhibitions of venom components isolated and extracted from *Pteromalus puparum* crude venom with different methods on the spreading of *Pieris rapae* hemocytes *in vitro*

A：等电点沉淀法 Isoelectric precipitation；B：乙醇沉淀法 Ethanol precipitation；C：硫酸铵沉淀法 Ammonium sulphate precipitation；D：硫酸铵沉淀法 + 40℃加热处理 Ammonium sulphate precipitation + heating at 40℃；E：硫酸铵沉淀法 + YM-10 滤膜截留法 Ammonium sulphate precipitation + centrifugal exclusion of molecular size with YM-10 filter membrane；F：硫酸铵沉淀法 + YM-50 滤膜截留法 Ammonium sulphate precipitation + centrifugal exclusion of molecular size with YM-50 filter membrane；G：硫酸铵沉淀法 + YM-100 滤膜截留 Ammonium sulphate precipitation + centrifugal exclusion of molecular size with YM-100 filter membrane；H：毒液蛋白粗提液 Crude venom proteins；I：PBS 缓冲液（对照）Phosphate buffered saline (PBS) served as the control. 箭头示血细胞延展形成的伪足 The arrow indicates the spreading pseudopods of hemocytes. 标尺 Scale bar = 0.025 mm. 图 2 同 The same for Fig. 2.

2.3 不同提取分离方法得毒液组分的 SDS-PAGE 电泳分析

SDS-PAGE 电泳分析结果（图 3）表明，与毒液粗提液相比，7 种提取分离方法中，以等点沉淀法所得组分相对较纯，主要显示 3 条谱带，分子量在 45～116.2 kDa 范围内；乙醇沉淀法次之，主要显示有 5 条谱带，分子量在 24～116.2 kDa 范围内；饱和硫酸铵沉淀法 + 40℃加热处理和饱和硫酸氨沉淀法 + YM-100 为滤膜的分子大小离心截留法再次之，分子量也集中于 24～116.2 kDa 范围内。其他方法蛋白谱带组成与毒液粗提液相比则无明显的差异（图 3）。

3 讨论

本文就蝶蛹金小蜂毒液组分生物活性测定结果（图 1～2，表 1）表明，等电点沉淀法提取分离得到组分抑制寄主血细胞延展与包囊的活性最强，乙醇沉淀法次之。从等电点沉淀法等 7 种方法所获得的毒液蛋白的 SDS-PAGE 电泳谱带（图 3）多少来看，以等电点沉淀法所得组分相对最纯，乙醇沉淀法次之。由此综合认为，7 种方法中以等电点沉淀法提取分离该寄生蜂毒液相对为佳。但从等电点沉淀法分离组分的 SDS-PAGE 图谱来看，至少仍有 3 条主要谱

表 1 不同提取分离方法所得蝶蛹金小蜂毒液组分对抑制菜粉蝶蛹离体血细胞延展和包囊能力的比较

Table 1 Comparison of inhibition capability of venom components isolated and extracted from *Pteromalus puparum* crude venom with different methods on the spreading and encapsulation of *Pieris rapae* hemocytes *in vitro*

毒液蛋白提取分离方法 Isolation and extraction methods of venom proteins		每纳克毒液组分延展抑制率 Spreading inhibitory ratio per ng of venom components (%)		每纳克毒液组分包囊抑制率 Encapsulation inhibitory ratio per ng of venom components (%)
		0.5 h	4 h	4 h
等电点沉淀法 Isoelectric precipitation		64.15 ± 3.50 aA	74.49 ± 0.69 aA	42.95 ± 7.91 aA
乙醇沉淀法 Ethanol precipitation		18.38 ± 0.40 bB	20.82 ± 0.06 bB	12.09 ± 1.12 bB
饱和硫酸铵沉淀法 Ammonium sulphate precipitation		4.55 ± 0.21 eE	5.17 ± 0.11 eE	3.07 ± 0.34 dCD
饱和硫酸铵沉淀法 + 40℃加热 Ammonium sulphate precipitation + heating at 40℃		7.83 ± 0.39 dD	8.93 ± 0.07 dD	5.60 ± 0.25 cC
饱和硫酸铵沉淀法 + 分子大小离心截留法 Ammonium sulphate precipitation + centrifugal exclusion of molecular size	YM-10	0.13 ± 0.10 fF	1.61 ± 0.04 fF	0.65 ± 0.17 eEF
	YM-50	0.15 ± 0.06 fF	5.26 ± 0.07 eE	2.05 ± 0.73 dDE
	YM-100	12.79 ± 1.23 cC	20.07 ± 0.18 cC	10.61 ± 2.67 bB
毒蛋白提取液 Crude venom proteins		0.45 ± 0.01 fF	0.51 ± 0.06 gG	0.30 ± 0.04 eF

表中数据为平均数 ± 标准差($n = 3$)。经方差分析和 Duncan 新复极差多重比较分析结果表明，同一列中具不同大、小字母的数据间差异分别达到极显著($P < 0.01$)和显著水平($P < 0.05$)。The data are expressed as mean ± *SD*. In the same column data followed by the uppercase ($P < 0.01$) and lowercase ($P < 0.05$) letters are significantly different according to ANOVA and Duncan's multiple range test. YM-10, YM-50, YM-100: 分子量截留范围分别小于 10, 50 和 100 kDa. The molecular weight cut-off exclusion limits are below 10, 50 and 100 kDa, respectively.

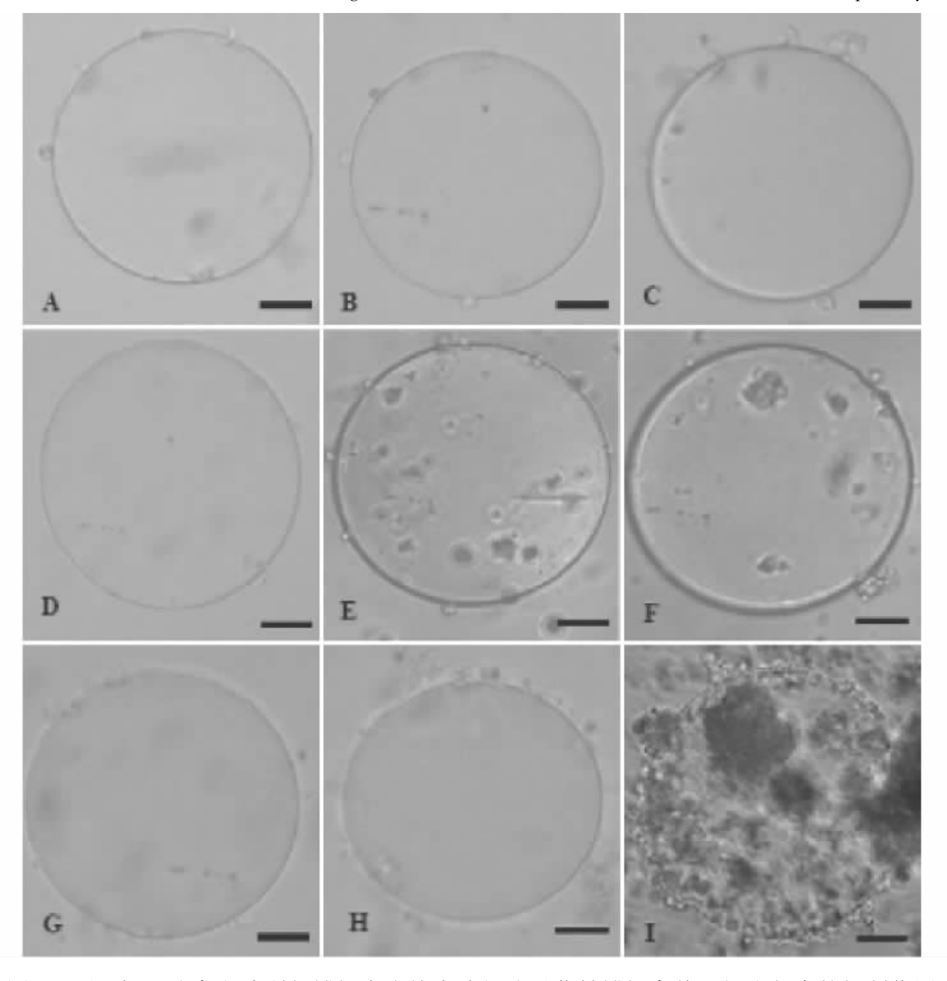


图 2 不同提取分离方法所得蝶蛹金小蜂毒液组分对菜粉蝶蛹离体血细胞包囊的抑制作用

Fig. 2 Inhibitions of venom components isolated and extracted from *Pteromalus puparum* crude venom with different methods on the encapsulation capability of *Pieris rapae* hemocytes *in vitro*

带，还未完全纯化，因此要真正明确何种组分具有抑制寄主血细胞延展和包囊活性，还得在此基础上利用柱层析等方法进一步纯化。

从以醋酸钠缓冲液调节 pH 至 5.0 的等电点沉

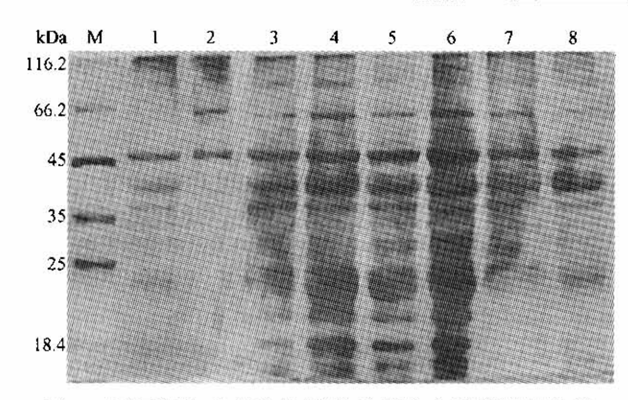


图 3　不同提取分离方法所得蝶蛹金小蜂毒液组分的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3　SDS-PAGE analysis of venom components isolated and extracted from *Pteromalus puparum* crude venom with different methods

1：乙醇沉淀法 Ethanol precipitation；2：等电点沉淀法 Isoelectric precipitation；3：毒液蛋白粗提液 Crude venom proteins；4：硫酸铵沉淀法 Ammonium sulphate precipitation；5：硫酸铵沉淀法 + YM-10 滤膜截留法 Ammonium sulphate precipitation + centrifugal exclusion of molecular size with YM-10 filter membrane；6：硫酸铵沉淀法 + YM-50 滤膜截留法 Ammonium sulphate precipitation + centrifugal exclusion of molecular size with YM-50 filter membrane；7：硫酸铵沉淀法 + YM-100 滤膜截留 Ammonium sulphate precipitation + centrifugal exclusion of molecular size with YM-100 filter membrane；8：硫酸铵沉淀法 + 40℃加热处理 Ammonium sulphate precipitation + heating at 40℃. M：蛋白分子量标准 Protein molecular weight marker.

淀法获得毒液组分表现高活性可知，蝶蛹金小蜂毒液活性组分等电点偏酸性，系酸性蛋白，这与 Leluk 等(1989)证实寄生蜂毒液蛋白大部分都是酸性蛋白的结论是相符的。就 3 种分子大小截留法获得的毒液组分活性比较来看，以 YM-100 滤膜截留的活性最强，由此可推断该寄生蜂毒液活性组分天然分子量多大于 100 kDa。

就硫酸铵沉淀法而言，Rivers 等(2006)分别用 5%，15%，25%，40%，65%，80%，90%和 100%硫酸铵沉淀丽蝇蛹集金小蜂 *Nasonia vitripennis* 的毒液，结果发现仅以 5%，80%和 100%硫酸铵沉淀的组分有活性，其中以 80%沉淀的活性为最高；就沉淀组分的 SDS-PAGE 电泳并经考马斯亮蓝 G-250 染色的图谱来看，5%处理的谱带与毒液粗提液相似，而后两者中仅各有 4 和 2 条谱带，相对较纯。本文仅选用了 75%硫酸铵对蝶蛹金小蜂毒液进行了沉淀，获得的组分表现有活性，但从其 SDS-PAGE 电泳并经银染的图谱来看与毒液粗提液相似，即说明纯度不高。至于沉淀蝶蛹金小蜂毒液的硫酸铵浓度究竟多少合适，则有待与 Rivers 等(2006)一样开展系列的浓度比较。另值得一提的是 Rivers 等(2006)采用了考马斯亮蓝 G-250 染色显示 SDS-PAGE 电泳谱带，以判断硫酸铵沉淀组分的组成与纯度，这容易掩盖了那些低浓度的组分谱带，因为该蛋白染色法灵敏度明显低于银染法(奥斯伯等，2005)。因此，我们认为在检测毒液提取分离组分组成与相对纯度时采用银染法更合适。

参 考 文 献 (References)

Asgari S, 2006. Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 61: 146 – 156.

Asgari S, 2007. Endoparasitoid venom proteins as modulators of host immunity and development. In: Rivers DB, Yolder J eds. Recent Advances in the Biochemistry, Toxicity, and Mode of Action of Parasitic Wasp Venoms. Research Signpost, Kerala, India. 57 – 73.

Ausubel FM, Kingstone RE, Seidman JG, Struhl K, Brent R, Moore DD, Smith JA (Translated by Ma XJ *et al.*), 2005. Short Protocols in Molecular Biology. 4th ed. Science Press, Beijing. 404 – 405. [FM 奥斯伯，RE 金斯顿，JG 塞德曼，K 斯特拉尔，R 布伦特，DD 穆尔，JA 史密斯(马学军等译)，2005. 精编分子生物学实验指南(第四版). 北京：科学出版社. 404 – 405]

Beckage NE, Gelman DB, 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: implications for new biologically based strategies for insect control. *Annu. Rev. Entomol.*, 49: 299 – 330.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 – 254.

Cai J, Ye GY, Hu C, 2004. Parasitism of *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae) by a pupal endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae): effects of parasitization and venom on host hemocytes. *J. Insect Physiol.*, 50: 315 – 322.

Harris ELV, Angal S, 1995. Protein Purification Methods: A Practical Approach. Oxford University Press Inc., New York, USA. 151 – 160.

Labrosse C, Eslin P, Doury G, Drezen JM, Poiri M, 2005a. Haemocyte changes in *D. melanogaster* in response to long gland components of the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*: a Rho-GAP protein as an important factor. *J. Insect Physiol.*, 51: 161 – 170.

Labrosse C, Stasiak K, Lesobre J, Grangeia A, Huguet E, Drezen JM, Poiri M, 2005b. A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulard* (Hymenoptera, Figitidae)-*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 93 – 103.

Laemmli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680 – 685.

Leluk J, Schmidt J, Jones D, 1989. Comparative studies on the protein composition of Hymenopteran venom reservoirs. *Toxicon*, 27: 105 – 114.

Moreau SJM, Guillot S, 2005. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 35: 1 209 – 1 223.

Pennacchio F, Strand MR, 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.*, 51: 233 – 258.

Rivers DB, Uckan F, Ergin E, 2006. Characterization and biochemical analyses of venom from the ectoparasitic wasp *Nasonia vitripennis*

(Walker)(Hymenoptera: Pteromalidae). *Arch. Biochem. Physiol.*, 61: 21 – 41.

Simpson RJ, 2004. Purifying Proteins for Proteomics: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 713 – 718.

Swain M, Ross NW, 1995. A silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 16: 948 – 951.

Tang QY, Feng MG, 2007. DPS Data Processing System: Experimental Design, Statistical Analysis and Data Mining. Science Press, Beijing. 85 – 143. [唐启义,冯明光,2007. DPS 数据处理系统:实验设计、统计分析及数据挖掘.北京:科学出版社. 85 – 143]

Zhang G, Schmidt O, Asgari S, 2006. A calreticulin-like protein from endoparasitoid venom fluid is involved in host hemocyte inactivation. *Dev. Comp. Immunol.*, 30: 756 – 764.

Zhang Z, Ye GY, Cai J, Hu C, 2005. Comparative venom toxicity between *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) toward the hemocytes of their natural hosts, non-target insects and cultured insect cells. *Toxicon*, 46: 337 – 349.

Zhang Z, Ye GY, Hu C, 2004. Effects of venom from two pteromalid wasps *Pteromalus puparum* and *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Pteromalidae) on the spreading, viability and encapsulation capacity of *Pieris rapae* hemocytes. *Acta Entomologica Sinica*, 47: 551 – 561. [张忠,叶恭银,胡萃,2005. 两种金小蜂毒液对菜粉蝶蛹血细胞延展、存活及包囊作用的影响. 昆虫学报, 47: 551 – 561]

Zhu JY, Ye GY, Hu C, 2008. Molecular cloning and characterization of acid phosphatase in venom of the endoparasitoid wasp *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Toxicon*, 51: 1 391 – 1 399.

Zhu JY, Ye GY, Hu C, 2008. Research progress on venom proteins of parasitic Hymenoptera. *Acta Phytophylacica Sinica*, 35: 270 – 278. [朱家颖, 叶恭银, 胡萃, 2008. 寄生蜂毒液蛋白的研究进展. 植物保护学报, 35: 270 – 278]

(责任编辑: 邓艳)